

尼氟灭酸对糖尿病人血小板胞浆游离钙及聚集功能的影响

聂大年, 尹松梅, 谢双锋, 王晓刚, 李益清, 马丽萍, 王秀菊, 吴裕丹, 冯坚红
(中山大学附属第二医院血液内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨糖尿病人血小板胞浆游离钙 ($[Ca^{2+}]_i$)、血小板聚集率变化及氯通道阻断剂尼氟灭酸对其的影响。【方法】用 Fura-2 荧光测钙技术检测血小板 $[Ca^{2+}]_i$, 血小板聚集仪检测血小板聚集率, 观察氯通道阻断剂尼氟灭酸、钙通道阻断剂硝苯地平及两者联合对糖尿病人的血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 、血小板聚集率的作用。【结果】糖尿病人血小板聚集率为 $(74.9 \pm 3.7)\%$, 高于正常人 ($P < 0.05$); 糖尿病人的静息血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 值、钙释放、钙内流分别为 $(124.5 \pm 38.1) \text{ nmol/L}$ 、 $(497.1 \pm 95.1) \text{ nmol/L}$ 、 $(354.3 \pm 75.0) \text{ nmol/L}$, 均高于正常人 (P 均 < 0.05); 尼氟灭酸及硝苯地平抑制血小板钙内流呈浓度依赖性, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 的尼氟灭酸 ($50 \mu\text{mol/L}$) 对糖尿病人血小板钙内流的抑制率为 $(54.7 \pm 4.5)\%$, 对血小板聚集率的抑制率为 $(32.3 \pm 21.4)\%$; IC_{50} 的硝苯地平 ($7.5 \mu\text{mol/L}$) 对糖尿病人血小板钙内流的抑制率为 $(17.9 \pm 11.9)\%$, 对血小板聚集率的抑制率为 $(32.3 \pm 20.4)\%$; 尼氟灭酸联合硝苯地平对糖尿病人血小板钙有抑制作用, 联合作用时尼氟灭酸对钙内流抑制率为 $(51.9 \pm 12.8)\%$; 硝苯地平对钙内流抑制率为 $(12.4 \pm 8.5)\%$ (P 均 < 0.05), 两者间不存在交互效应。【结论】糖尿病人血小板聚集率、静息血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 及钙运动均高于正常人, 血小板呈高反应状态。尼氟灭酸可抑制糖尿病人血小板聚集和钙内流, 可能与血小板膜存在对尼氟灭酸敏感的氯通道有关。尼氟灭酸与硝苯地平联合对糖尿病患者的血小板钙运动无协同及遏制作用。

关键词: 胞浆游离钙; 尼氟灭酸; 硝苯地平; 血小板; 糖尿病

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0533-04

Effects of Niflumic Acid on Thrombocytic Cytoplasmic Free Calcium and Platelet Aggregation in Patients with Diabetes Mellitus

NIE Da-nian, YIN Song-mei, XIE Shuang-feng, WANG Xiao-gang, LI Yi-qing, MA Li-ping,
WANG Xiu-ju, WU Yu-dan, FENG Jian-hong
(Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To study the effects of niflumic acid (NFA) on the thrombocytic cytoplasmic free calcium $[Ca^{2+}]_i$ and platelet aggregation rate (PAG) in diabetic patients. 【Methods】Thrombocytic $[Ca^{2+}]_i$ was detected by Fura-2 fluorescent technique, and PAG was detected by platelet aggregometer. We studied the effects of NFA, a chloride channel blocker, nifedipine, a calcium channel blocker, and their combining effects on thrombocytic $[Ca^{2+}]_i$ and PAG in diabetic patients respectively. 【Results】The PAG and $[Ca^{2+}]_i$ in diabetic patients were significantly higher than that in control group. The platelet resting $[Ca^{2+}]_i$, Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx in diabetic patients were higher than the control group. NFA and Nifedipine reduced the platelet Ca^{2+} influx which induced by thrombin and these effects were dose-dependent. The concentration producing 50% inhibition (IC_{50}) of NFA was $50 \mu\text{mol/L}$, the inhibition rate of thrombocytic $[Ca^{2+}]_i$ was $(54.7 \pm 4.5)\%$, and the inhibition rate of PAG was $(32.3 \pm 21.4)\%$ when the concentration of NFA was $50 \mu\text{mol/L}$. The IC_{50} of Nifedipine was $7.5 \mu\text{mol/L}$, the inhibition rate of thrombocytic $[Ca^{2+}]_i$ was $(17.9 \pm 11.9)\%$ and the inhibition rate of PAG was $(32.3 \pm 20.4)\%$ when the concentration of nifedipine was $7.5 \mu\text{mol/L}$. NFA ($50 \mu\text{mol/L}$) combining with nifedipine ($7.5 \mu\text{mol/L}$) inhibited platelet Ca^{2+} influx induced by thrombin in diabetes patients. The effects of NFA and nifedipine were independent. 【Conclusions】Platelets in patients with diabetes are hyperactive. NFA reduces the PAG and platelet $[Ca^{2+}]_i$ influx by blocking the chloride channels on platelet membrane in diabetic patients. There are no interactions between NFA and nifedipine

收稿日期: 2006-04-27

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003C32709); 广东省重点攻关项目 (99M04810G)

作者简介: 聂大年 (1970-), 男, 广东新会人, 硕士, 主治医师; 尹松梅, 教授, 通信作者. E-mail: yin songmei@21cn.com

on the movement of platelet $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: cytoplasmic free calcium; niflumic acid; nifedpine; platelet; diabetes mellitus

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):533-536]

血小板胞浆游离钙 ($[Ca^{2+}]_i$) 的运动和氯通道有密切关系, 但机制还不是很清楚。我们观察了糖尿病人血小板聚集、血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 及氯通道阻断剂尼氟灭酸的影响, 探讨糖尿病人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 紊乱与氯通道的关系, 希望能从信号转导环节中寻找阻遏糖尿病患者血小板活化途径, 减少血栓的发生。

1 材料和方法

1.1 血标本来源

入选患者为 2004 年 1 月至 6 月在我院内分泌科初诊为糖尿病的住院病人, 符合 1999 年 WHO 糖尿病的诊断标准, 男 9 例, 女 8 例, 中位年龄 50 (26~68) 岁, 均未用过降糖药。正常人为 2004 年 1 月至 6 月在我院保健科体检的健康体检者, 男 8 例, 女 9 例, 中位年龄 45 (24~67) 岁。糖尿病人及正常人近 1 个月内未服过抗血小板药物及拮抗剂。

1.2 实验试剂

钙离子荧光探针 (Fura-2/AM)、硝苯地平、尼氟灭酸均购自美国 Sigma 公司; 凝血酶购自美国 Pacific Hemostasis 公司。其他相关试剂购自上海生物工程技术有限公司。

1.3 血小板聚集测定

取肘静脉血, 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ACD) 按 1:9 抗凝, 常规制备富血小板血浆, 调整血小板数在 $(100\sim300) \times 10^9/L$, 取 200 μL 富血小板血浆分别加入不同浓度的尼氟灭酸、硝苯地平, 孵育 2 min, 以终浓度为 0.5 U/L 的凝血酶为激动剂, 在血液凝集仪上连续测定 5 min 血小板聚集率, 以血小板最大聚集率为观察指标。根据计算公式: 抑制率 (%) = (用药前值 - 用药后值) / 用药前值 $\times 100\%$, 计算不同浓度尼氟灭酸、硝苯地平对血小板聚集率的抑制率。

1.4 血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定

ACD (1:6) 抗凝血, 制备富血小板血浆, 含牛血清的 HEPES 液洗涤、悬浮血小板, 调整血小板数 $(100\sim300) \times 10^9/L$, 负载 Fura-2/AM (2 $\mu mol/L$), 避

光、摇动 45 min, 以终浓度为 0.5 U/L 的凝血酶为激动剂, 在荧光分光光度计上测加凝血酶前后的荧光值, 根据公式计算出血小板 $[Ca^{2+}]_i$, 即为血小板静息 $[Ca^{2+}]_i$ 和峰位 $[Ca^{2+}]_i$ 。再在平台期分别加入不同浓度的尼氟灭酸和硝苯地平, 测定尼氟灭酸和硝苯地平对血小板 Ca^{2+} 内流的抑制率。血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的计算公式:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times [F_0(R - R_{min})] / [F_s(R_{max} - R)]$$

其中, $K_d = 224 \text{ nmol/L}$, 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 复合物的解离常数; F_0 = 无 Ca^{2+} (零状态) 时标本在 380 nm 的荧光值; F_s = 饱和 Ca^{2+} 时标本在 380 nm 的荧光值; R = 标本 340 nm 和 380 nm 的荧光比值; R_{max} = 饱和 Ca^{2+} 时标本 340 nm 和 380 nm 的荧光比值; R_{min} = 零状态 Ca^{2+} 时标本 340 nm 和 380 nm 的荧光比值。

药物对血小板 Ca^{2+} 内流的抑制率的计算公式:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{加药前平台期}[Ca^{2+}]_i - \text{加药后平台期}[Ca^{2+}]_i}{\text{加药前平台期}[Ca^{2+}]_i - \text{静息}[Ca^{2+}]_i} \times 100\%$$

1.5 统计学处理

计量资料的描述用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两独立样本均数的比较用成组 t 检验; 药物作用前后用配对 t 检验; 两药物的交互作用用析因设计的方差分析。所有数据均应用 SPSS11.0 统计软件处理, 检验水准定为 $P = 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 凝血酶激动的糖尿病人血小板最大聚集率

糖尿病人血小板最大聚集率为 $74.9\% \pm 13.7\%$, 高于正常人的 $61.6\% \pm 13.5\%$ ($P < 0.05$)。

2.2 凝血酶激动的糖尿病人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

糖尿病人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 静息值、钙释放和钙内流均高于正常人, 见表 1。

2.3 尼氟灭酸、硝苯地平对凝血酶激动的糖尿病人血小板聚集率和血小板钙内流的作用

量效关系分析显示, 单独作用时, 尼氟灭酸、硝苯地平均可抑制血小板钙内流, 两药都呈浓度依赖性, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别约为 50 $\mu mol/L$ 、

表1 凝血酶激动的两组血小板 $[Ca^{2+}]_i$

Table 1 Platelet cytoplasmic free calcium induced by thrombin

($\bar{x} \pm s$, nmol/L)

Group	n	Resting $[Ca^{2+}]_i$	Peak $[Ca^{2+}]_i$	Ca^{2+} release	Ca^{2+} influx
Normal control	17	106.2 \pm 24.2	564.2 \pm 85.2	458.0 \pm 83.7	320.4 \pm 85.2
Diabetes mellitus	17	124.5 \pm 38.1	621.6 \pm 111.2	497.1 \pm 95.1	354.3 \pm 75.0
t		2.83	2.97	2.23	2.34
P		0.004	0.004	0.028	0.021

7.5 μ mol/L。50 μ mol/L 尼氟灭酸及 7.5 μ mol/L 硝苯地平对凝血酶激动的糖尿病人血小板集聚和钙内流均有抑制作用,见表 2。

表2 尼氟灭酸、硝苯地平对糖尿病人血小板聚集率和血小板钙内流的作用

Table 2 Effects of niflumic acid and nifedipine on platelet aggregation rate and Ca^{2+} influx of platelet in diabetic patients ($\bar{x} \pm s$)

	Platelet aggregation rate (%)	Plateau $[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Ca^{2+} influx (nmol/L)
Thrombin	74.9 \pm 3.7	506.5 \pm 113.2	368.7 \pm 78.7
Niflumic acid	50.1 \pm 17.4	293.9 \pm 63.3	156.1 \pm 43.0
Inhibition rate (%)	32.3 \pm 1.4		54.7 \pm 4.5
t	5.79		10.52
P	<0.001		<0.001
Thrombin	74.9 \pm 3.7	477.3 \pm 106.8	357.0 \pm 82.6
Nifedipine	50.7 \pm 18.3	412.7 \pm 97.0	292.4 \pm 76.7
Inhibition rate (%)	32.3 \pm 0.4		17.9 \pm 1.9
t	5.87		6.07
P	<0.001		<0.001

2.4 尼氟灭酸和硝苯地平联合对凝血酶激动的糖尿病患者血小板钙内流的作用

联合作用时,经析因方差分析,50 μ mol/L 尼氟灭酸对凝血酶激动的糖尿病人血小板平台期 $[Ca^{2+}]_i$ 和钙内流及其抑制率的主效应均有统计学

表3 尼氟灭酸和硝苯地平联合对糖尿病患者血小板钙内流的作用

Table 3 Combining effects of niflumic acid and nifedipine on Ca^{2+} influx of platelet in diabetic patients ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Plateau $[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Ca^{2+} influx (nmol/L)	Inhibition rate of Ca^{2+} influx (%)
Control	10	495.2 \pm 138.7	363.9 \pm 95.5	
Niflumic acid	10	301.9 \pm 72.6 ¹⁾	170.5 \pm 42.9 ¹⁾	51.9 \pm 12.9 ¹⁾
Nifedipine	10	462.8 \pm 94.8	339.5 \pm 71.4	12.42 \pm 8.51 ¹⁾
Niflumic acid+nifedipine	10	284.8 \pm 60.5	153.4 \pm 45.0	56.11 \pm 14.95

Variance analysis for factorial design, 1)P< 0.05

意义; 7.5 μ mol/L 硝苯地平对钙内流抑制率的主效应有统计学意义。二者之间不存在交互效应(P > 0.05), 尼氟灭酸和硝苯地平对糖尿病人血小板钙内流抑制率的影响相互独立(表 3)。

3 讨论

糖尿病患者具有血栓形成的危险,其中血小板功能异常是重要的始动因素之一^[1]。血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 作为细胞内的第二信使在血小板的信号转导和活化中起重要的作用,是反映血小板功能的重要指标之一。有作者研究显示,糖尿病人血小板胞内 Ca^{2+} 稳态调节机制紊乱^[2-4]。本实验同样观察到糖尿病人血小板的静息 $[Ca^{2+}]_i$ 、凝血酶激动后的峰位 $[Ca^{2+}]_i$ 、平台 $[Ca^{2+}]_i$ 、钙释放值、钙内流值均较正常人升高,血小板的最大聚集率亦高于正常人。说明糖尿病患者血小板反应性高,刺激的阈值降低容易被激活,在且其高反应性与血小板的钙释放及钙内流增高有关,这与我们既往的研究结果一致^[5]。

目前关于血小板氯通道的研究资料不多, Mahaut-Smith 用全细胞膜片钳技术首次证明了在血小板上存在氯离子通道,随后的研究认为这种氯通道的活性依赖于胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ^[6-9]。我们既往的研究也证实血小板上存在氯通道,并首次发现尼氟灭酸可以抑制血小板胞浆游离钙的升高^[10]。

本实验中使用的尼氟灭酸是比较特异的钙激活氯通道阻断剂。我们观察到,随着尼氟灭酸浓度增加,对凝血酶激动血小板的钙内流抑制作用增强,呈浓度依赖性,IC₅₀约为 50 μ mol/L,说明血小板膜上存在对尼氟灭酸敏感的氯通道,进一步证明氯通道开放在调节血小板 Ca^{2+} 内流中起重要作用。50 μ mol/L 尼氟灭酸对凝血酶激动的糖尿病人血小板集聚和血小板钙内流均有抑制作用,提示尼氟灭酸可以抑制凝血酶激动的糖尿病人血小板活化,为临床应用氯通道阻断剂控制糖尿病患者血小板活化提供新思路。

Ca^{2+} 通道是调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的主要途径。血小板膜上既有电压依赖性 Ca^{2+} 通道,也有受体操纵性 Ca^{2+} 通道。硝苯地平属于二氢吡啶类可选择性阻断 L 型电压依赖性 Ca^{2+} 通道。我们既往的实验证明硝苯地平可以抑制凝血酶诱导的血小板聚集、血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高、钙释放和钙内流^[10]。在本实验中硝苯地平对血小板钙内流 IC_{50} 约为 $7.5 \mu\text{mol/L}$, $7.5 \mu\text{mol/L}$ 硝苯地平对凝血酶诱导的糖尿病患者的血小板聚集和钙内流有抑制作用,但抑制强度并不大,考虑可能与使用的硝苯地平剂量偏小有关。

氯通道在血小板的活化中是原发性改变还是由于 Ca^{2+} 通道活性增高而继发改变(反馈调节)尚不清楚。已有研究证实,生理特点与血小板有许多相似之处的血管内皮细胞上氯通道的开放使 Cl^- 内流,导致细胞膜超极化,从而使 Ca^{2+} 进入细胞的电化学趋势增加^[11-13]。本实验中观察到,尼氟灭酸和硝苯地平对糖尿病血小板钙内流抑制率的影响相互独立,两者之间不存在交互效应,提示糖尿病人血小板膜上的氯通道的活性状态可能不依赖 Ca^{2+} 通道活性的改变。具体的机制还须采用更直接的实验技术对糖尿病人血小板膜氯通道进行更多的研究。

参考文献:

- [1] VINIK A I, ERBAS T, PARK T S, et al. Platelet dysfunction in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(8): 1476-1485.
- [2] ISHII H, UMEDA F, HASHIMOTO T, et al. Changes in phosphoinositide turnover, Ca^{2+} mobilization, and protein phosphorylation in platelets from NIDDM patients [J]. *Diabetes*, 1990, 39(12): 1561-1568.
- [3] WATALA C, BONCLER M, GOLANSKI J, et al. Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus [J]. *Eur J Haematol*, 1998, 61(5): 319-326.
- [4] PELLEGGATTA F, FOLLI F, RONCHI P, et al. Deranged platelet calcium homeostasis in poorly controlled IDDM patients [J]. *Diabetes Care*, 1993, 16(1): 178-183.
- [5] 李益清, 尹松梅, 谢双锋, 等. 妊娠期糖尿病患者血小板功能状态的研究 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(5): 368.
- [6] JENTSCH T J, STEIN V, WEINREICH F, et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 503-568.
- [7] MAHAUT-SMITH M P. Chloride channels in human platelets: evidence for activation by internal calcium [J]. *J Membr Biol*, 1990, 118(1): 69-75.
- [8] MACKENZIE A B, MAHAUT-SMITH M P. Chloride channels in excised membrane patches from human platelets: effect of intracellular calcium [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1278(1): 131-136.
- [9] PIPILI E. Platelet membrane potential: Simultaneous measurements of dis- C_3 - (5) fluorescence and optical density [J]. *Thromb Haemost*, 1985, 54(3): 645-649.
- [10] 尹松梅, 陈晓琳, 聂大年, 等. 氯通道阻断剂对血小板浆游离钙和血小板聚集的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3): 170-174.
- [11] 魏文利, 关永源, 贺华, 等. ATP 诱导的血管内皮细胞氯电流及其与 Ca^{2+} 运动的关系 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001, 15(2): 125-130.
- [12] FANG Q Z, ZHONG N, ZHANG Y, et al. Tetradrine inhibits Ca^{2+} -activated chloride channel in cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(3): 327-333.
- [13] FRINGS S, REUTER D, KLEENE S J. Neuronal Ca^{2+} -activated Cl^- channels: homing in on an elusive channel species [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 60(3): 247-289.

(编辑 黄小延)